製品コード RR42LR

研究用

TaKaRa

SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus), ROX plus

説明書

v201309Da

SYBR® *Premix Ex Taq*（Tli RNaseH Plus）, ROX plus は、SYBR® Green I＊1 を用いたインターカレーター法によるリアルタイム PCR 専用試薬です。2 ×濃度のプレミックスタイプ試薬で、リアルタイムモニタリングに適した濃度の SYBR® Green I および ROX Reference Dye をあらかじめ含んでおり、反応液の調製が簡単です。また、耐熱性 RNaseH である Tli RNaseH もあらかじめ 2 ×プレミックス試薬中に添加されており、cDNA を鋳型とした場合の残存 mRNA による PCR 反応阻害を極限まで抑制できます。
本製品は高速反応タイプの試薬で、やや長めのターゲットにも対応可能です。抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS と最適化されたバッファーの組み合わせにより、高い増幅効率、高い検出感度でリアルタイム PCR を行うことができ、再現性よく信頼性の高い解析が可能です。

本製品の適応機種

◆ ROX Reference Dye による補正を必要とする装置＊2
- StepOnePlus™ Real-Time PCR System（Life Technologies 社）

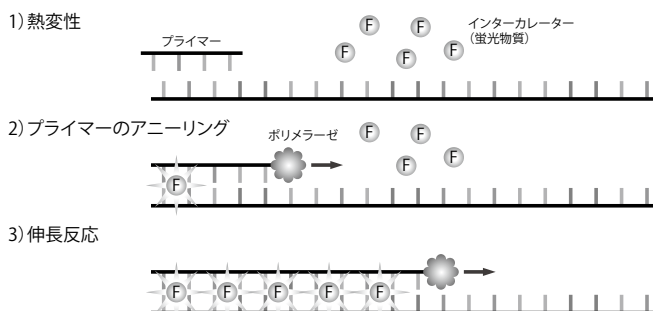
◆ ROX Reference Dye による補正の必要がない装置でも、使用可能。
- Thermal Cycler Dice Real Time System Single（製品コード TP850/TP870）＊3
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
- Smart Cycler® II System＊4（製品コード SC200N/SC210N）など

＊ 1：Molecular Probes Inc. より研究用試薬として SYBR® Green I ライセンスを受けています。SYBR® は Molecular Probes Inc. の登録商標です。
＊ 2：ROX Reference Dye II で補正を行う Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）には、ROX Reference Dye を別添付している SYBR® *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus), Bulk（製品コード RR420L/W）の使用を推奨します。
＊ 3：Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）には、SYBR® *Premix Ex Taq* II（Tli RNaseH Plus）シリーズ（製品コード RR820S/A/B/L/W、RR82LR/WR）の使用を推奨します。
＊ 4：Smart Cycler® は Cepheid 社の登録商標です。

I. 原理

本製品では、*TaKaRa Ex Taq* HS による PCR 増幅を行い、PCR 増幅産物を SYBR® Green I によりリアルタイムでモニタリングするための試薬です。
増幅にホットスタート PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS を使用しているため、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。

<u>インターカレーター法</u>

二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬（インターカレーター：SYBR® Green I など）を反応系に加え、増幅に伴う蛍光を検出する方法です。
ポリメラーゼ反応によって合成された二本鎖 DNA にインターカレーターが結合すると、蛍光を発します。この蛍光強度を検出することで、定量だけでなく増幅 DNA の融解温度を測定することもできます。

II. 内容［200 回（50 μl 反応系）］

SYBR® *Premix Ex Taq*（2×）（Tli RNaseH Plus）, ROX plus ＊　　5 ml × 1 本

＊：*TaKaRa Ex Taq* HS、dNTP Mixture、Mg^{2+}、Tli RNaseH、SYBR® Green I および ROX Reference Dye を含む。

III. 本製品以外に必要な試薬、機器（主なもの）

1. リアルタイム PCR 用遺伝子増幅システム（authorized instruments）
2. 専用反応チューブあるいはプレート
3. PCR 用プライマー＊
4. 滅菌蒸留水
5. マイクロピペットおよびチップ（滅菌処理したもの。フィルター付きが望ましい）

＊：リアルタイム PCR 用プライマーの設計方法は、「VIII.（2）プライマー設計について」をご参照ください。ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ遺伝子発現解析用途のリアルタイム RT-PCR プライマーの設計・合成には、当社のオンライン検索＆注文システム【Perfect Real Time サポートシステム】のご利用を推奨いたします。(http://www.takara-bio.co.jp/realtime/)

IV. 輸送　－ 80℃

V. 保存　4℃保存：6 ヶ月安定

必ず遮光してください。また、コンタミネーションには十分注意してください。

＊ 本製品は－ 80℃でお届けします。
長期保存する場合は、－ 80℃で保存してください。（－ 20℃保存は避けてください。）
いったん融解したものは 4℃保存し、6 ヶ月を目途にご使用ください。

VI. 操作上の注意

本製品を使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

（1） 使用時には、泡立てないよう緩やかに転倒混合し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬組成に偏りがあると十分な反応性が得られなくなります。ボルテックスによる混合は行わないでください。
なお、SYBR® *Premix Ex Taq*（2 ×）（Tli RNaseH Plus）, ROX plus を－ 80℃保存した場合、保存中に白色～黄白色の沈殿を生じることがあります。遮光して室温（～ 30℃程度）にしばらく置いた後、転倒混合することで完全に溶解します。沈殿が生じたままでは、試薬組成に偏りができますので、必ず均一に混合してからご使用ください。

（2） 反応液調製時には、試薬を氷上に置いてください。

（3） 本製品は SYBR® Green I および ROX Reference Dye を含んでいます。反応液調製時に強い光をあてないよう注意してください。

（4） 反応液の調製、分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

（5） 本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす恐れがあります。PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

VII. 操作

＜ StepOnePlus™ Real-Time PCR System を用いる場合の操作方法＞

※ Life Technologies 社の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq*（2×）（Tli RNaseH Plus）, ROX plus	10 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM ＊1
template（< 100 ng）＊2	2 μl	
dH_2O（滅菌蒸留水）	7.2 μl	
total	20 μl	

＊ 1：最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、添加量を PCR 反応液容量の 10%以下とする。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。（PCR 条件を至適化する場合は、VIII.（1）「実験条件の選び方」を参照してください。）

シャトル PCR 標準プロトコール

Holding Stage
　Step1：95℃　30 秒

Cycling Stage
　Number of Cycles：40
　Step1：95℃　 5 秒
　Step2：60℃　30 秒

Melt Curve Stage

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、StepOnePlus™ Real-Time PCR System の取扱説明書をご参照ください。

＜ Thermal Cycler Dice Real Time System Single および *Lite* を用いる場合の操作方法＞

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq*（2×）(Tli RNaseH Plus), ROX plus	12.5 μl	1×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
template（＜100 ng）＊2	2 μl	
dH_2O（滅菌蒸留水）	9.5 μl	
total	25 μl ＊3	

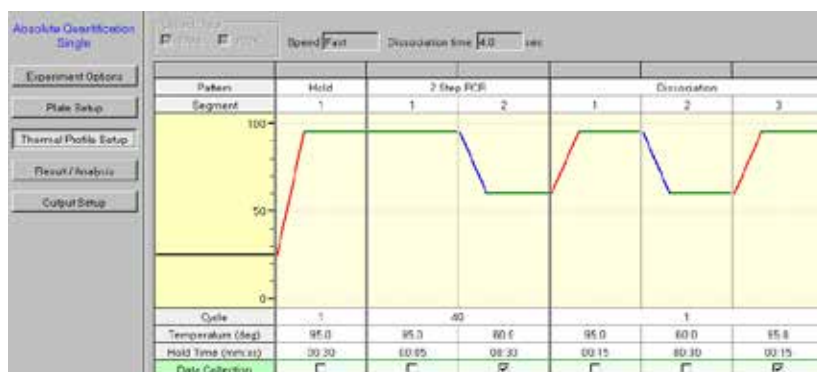
＊ 1：最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、添加量を PCR 反応液容量の 10%以下とする。

＊ 3：反応液量は 25 μl を推奨。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。PCR 条件を至適化する場合は、VIII. (1)「実験条件の選び方」をご確認ください。

シャトル PCR 標準プロトコール

Hold（初期変性）
Cycle：1
95℃　30 秒

2 Step PCR
Cycle：40
95℃　5 秒
60℃　30 秒

Dissociation

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、Thermal Cycler Dice Real Time System の取扱説明書をご参照ください。

＜ Smart Cycler® II System を用いる場合の操作方法＞

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq*（2×）（Tli RNaseH Plus）, ROX plus	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
template（＜ 100 ng）＊2	2 μl	
dH_2O（滅菌蒸留水）	9.5 μl	
total	25 μl	

＊1：最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 〜 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊2：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、添加量を PCR 反応液容量の 10%以下とする。

2. 反応チューブを Smart Cycler® II 用遠心機で軽く遠心後、Smart Cycler® II にセットし、反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。（PCR 条件を至適化する場合は、VIII.（1）「実験条件の選び方」を参照してください。）

シャトル PCR 標準プロトコール

Stage 1：初期変性
Hold
95℃　30 秒
Stage 2：PCR 反応
Repeat：40 times
95℃　 5 秒
60℃　20 秒
Stage 3：Melt Curve

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、Smart Cycler® II System の取扱説明書をご参照ください。

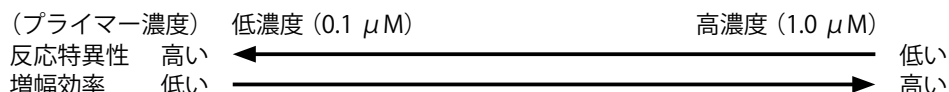
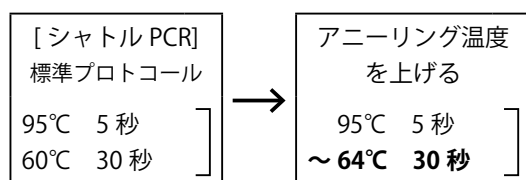
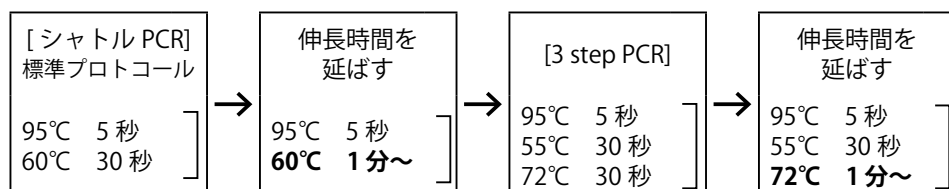
VIII. Appendix

(1) 実験条件の選び方

推奨条件（シャトル PCR 標準プロトコール）で良好な反応性が得られない場合には、下記の要領でプライマー濃度や PCR 条件の検討を行ってください。また、反応系によっては、特性が異なる他の SYBR® Premix シリーズリアルタイム PCR 試薬（製品コード RR820S/A/B/L/W、RR82LR/WR、RR091A/B）を用いることにより、反応性が大きく改善することもあります。
実験条件を選ぶ際には、反応特異性と増幅効率の両方を考慮して総合的に判断します。両方のバランスが取れた実験系では広い濃度範囲で正確な定量が可能です。

○ 反応特異性が高い実験系
- No Template Control でプライマーダイマーなどの非特異的増幅が生じない。
- 目的産物以外の非特異的増幅が生じない。

○ 増幅効率が高い実験系
- 増幅産物がより早いサイクルで検出される（Ct 値が小さい）。
- PCR 増幅効率が高い（理論値である 100%に近い）。

【プライマー濃度の検討】
プライマー濃度と反応特異性および増幅効率の間には、以下のような関係があります。反応特異性を上げるにはプライマー濃度を下げ、増幅効率を上げるにはプライマー濃度を上げます。

【PCR 条件の検討】
○ 反応特異性を上げるには—
アニーリング温度を上げると反応特異性が改善することがあります。増幅効率とのバランスを確認しながら、検討を行ってください。

○ 増幅効率を上げるには—
伸長時間を延ばすか、3 step PCR に変更することにより、増幅効率が改善することがあります。以下の手順で検討を行ってください。

○初期変性について
初期変性は通常 95℃、30 秒で充分です。環状プラスミドやゲノム DNA など変性しにくい鋳型でも、ほとんどの場合、この条件で良好に反応できます。鋳型の状態によっては、95℃、1 ～ 2 分程度に延長することが可能ですが、時間が長すぎると酵素の失活を招く恐れがありますので、2 分以上の条件は推奨しません。

【試薬と反応性の関係】

タカラバイオでは SYBR® Green Assay 用のリアルタイム PCR 試薬として 3 種類の製品を販売しており、それらの試薬と反応特異性および増幅効率の間には、以下のような関係があります。SYBR® *Premix Ex Taq*（Tli RNaseH Plus）（製品コード RR420S/A/B/L/W、RR42LR/WR）は増幅効率が高く、高速反応に対応した試薬ですが、反応特異性を上げるには、SYBR® *Premix Ex Taq* II（Tli RNaseH Plus）（製品コード RR820S/A/B/L/W、RR82LR/WR）や SYBR® Premix Dimer-Eraser（Perfect Real Time）（製品コード RR091A/B）の使用が有効です。

(2) プライマー設計について

リアルタイム PCR を効率的に行うには、反応性の良いプライマーを設計することが重要です。以下のガイドラインに沿って、増幅効率がよく、非特異的反応が起こらないプライマーを設計してください。

なお、ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ遺伝子発現解析用途のリアルタイム RT-PCR プライマーの設計・合成には、当社オンライン検索 & 注文システム【Perfect Real Time サポートシステム】*のご利用を推奨致します。(http://www.takara-bio.co.jp/realtime/)

＊：ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリの RefSeq に対するリアルタイム RT-PCR 用プライマーは設計済みです（ご注文によりカスタム合成してお届けします）。本製品と組合せて、SYBR® Green I 検出によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。
本システムを利用して RT-PCR プライマーを設計・合成された場合には、シャトル PCR 標準プロトコールで反応できます（P. 4 ～ 6 参照）。

■増幅産物

増幅サイズ	80 ～ 150 bp が最適（300 bp までは増幅可能）

■プライマー

長さ	17 ～ 25 mer
GC 含量	40 ～ 60%（望ましくは、45 ～ 55%）
Tm	Forward primer と Reverse primer の Tm 値が大きく異ならないこと。 Tm 値の計算は、専用のソフトウエアで行う。 OLIGO™ ＊1：63 ～ 68℃ Primer3 ＊2：60 ～ 65℃
配列	全体的に塩基の偏りがない配列にする。 部分的に GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける（特に 3' 末端）。 T/C の連続（polypyrimidine）は避ける。 A/G の連続（polypurine）は避ける。
3' 末端配列	3' 末端が GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける。 3' 末端塩基は、G または C が望ましい。 3' 末端塩基が T であるプライマーは避けたほうがよい。
相補性	プライマー内部およびプライマー間での 3 base 以上の相補的配列を避ける。 プライマーの 3' 末端同士が 2 base 以上相補する配列を避ける。
特異性	BLAST 検索でプライマーの特異性を確認する＊3。

＊ 1：OLIGO™ Primer Analysis Software（Molecular Biology Insights 社）
＊ 2：Primer3（http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/software/）
＊ 3：http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

※ タカラバイオ（株）では、【Perfect Real Time サポートシステム】に対応していない遺伝子についても、プライマーのカスタム設計・合成サービスを行っております。
詳細は、弊社各支店までお問い合わせください。
（東京支店：TEL 03-3271-8553、関西支店：TEL 077-565-6969）

（3）リアルタイム RT-PCR を行う場合

リアルタイム RT-PCR の逆転写反応には
- PrimeScript RT reagent Kit（Perfect Real Time）（製品コード RR037A/B）
- PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)（製品コード RR036A/B）
- PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)（製品コード RR047A/B）

の使用をお勧めします。本製品と組み合わせて使用することにより、信頼性の高い結果を得ることができます。

以下には PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)（製品コード RR036A/B）を用いた例を示します。

1. 下記に示す逆転写反応液を氷上で調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
5 × PrimeScript RT Master Mix（Perfect Real Time）	2 μl	1 ×
total RNA＊	x μl	
RNase Free dH_2O	up to 10 μl	

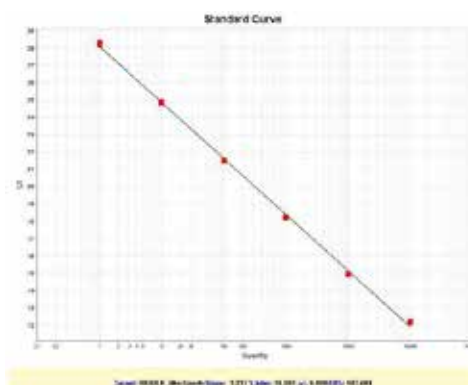
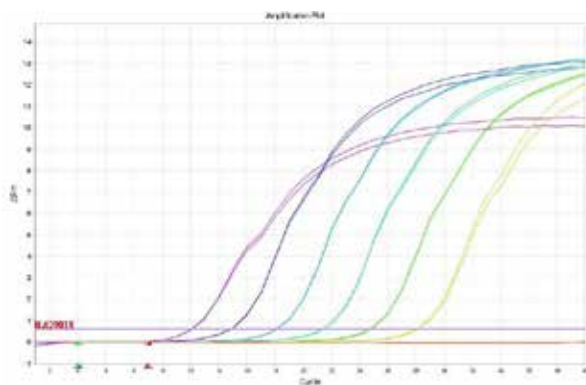
＊： 10 μl の反応液で逆転写できるのは、およそ 500 ng までの total RNA です。
逆転写反応は、必要に応じてスケールアップすることも可能です。

2. 反応液を軽く撹拌して均一にした後、逆転写反応を行う。
37℃　15 分（逆転写反応）
85℃　5 秒（逆転写酵素を熱失活させる）
4℃

3. PCR 反応を行う。
「VII. 操作」に記載されている方法に従う。

■ 反応例（StepOnePlus™ Real-Time PCR System を使用）

<u>逆転写反応</u>
鋳型：Mouse Heart total RNA (1 pg ～ 100 ng)

<u>リアルタイム PCR</u>
測定遺伝子：Mouse GAPDH
プライマー：Perfect Real Time サポートシステムのプライマーを使用

IX. 関連製品

SYBR® *Premix Ex Taq*™（Tli RNaseH Plus）（製品コード RR420S/A/B/L/W/WR）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II（Tli RNaseH Plus）（製品コード RR820S/A/B/L/W/LR/WR）
SYBR® Premix DimerEraser®（Perfect Real Time）（製品コード RR091A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time)（製品コード RR071A/B）
PrimeScript® RT reagent Kit（Perfect Real Time）（製品コード RR037A/B）
PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time)（製品コード RR036A/B）
PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)（製品コード RR047A/B）
One Step SYBR® PrimeScript® PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR096A/B）
One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit（Perfect Real Time）（製品コード RR066A/B）
One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit II（Perfect Real Time）（製品コード RR086A/B）
Thermal Cycler Dice® Real Time System Single（製品コード TP850/TP870）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
Smart Cycler® II System（製品コード SC200N/SC210N）

Perfect Real Time サポートシステム＊
（http://www.takara-bio.co.jp/realtime/）

＊：ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリの RefSeq に対するリアルタイム RT-PCR 用プライマーが設計済みです（ご注文によりカスタム合成してお届けします）。本製品と組合せて、SYBR® Green I 検出によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。

X. 参考文献

1）吉崎美和 , 向井博之（2005）実験医学別冊 バイオ実験で失敗しない！「検出と定量のコツ」, 第 3 章 核酸の検出と定量のコツ 4. リアルタイム定量 PCR のコツ, 120-126
2）吉崎美和 , 向井博之（2008）実験医学別冊 原理からよくわかる「リアルタイム PCR 実験ガイド」[3] 1）リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析 , 39-43

XI. 注意

・本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
・SYBR® は Molecular Probe Inc. の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

[L11] SYBR® Green I
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 5,436,134 and 5,658,751 and their foreign counterpart patent claims.
Takara PCR products containing SYBR® Green I are sold under license from Molecular Probes Inc. only for the usage in Real-time PCR for internal research purpose. These products are not to be used for the purpose such as; providing medical, diagnostic, or any other testing, analysis or screening services or providing clinical information or clinical analysis in return for compensations.

[L15] Hot Start PCR
Licensed under U.S. Patent No. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

[L46] SYBR®/Melting Curve Analysis
The purchase of this product includes a limited, non-transferable license for all fields other than human or veterinary in vitro diagnostics under specific claims of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627 and 5,871,908, owned by the University of Utah Research Foundation or Evotec Biosystems GmbH and licensed to Idaho Technology, Inc. and Roche Diagnostics GmbH, to use only the enclosed amount of product according to the specified protocols. No right is conveyed, expressly, by implication, or by estoppel, to use any instrument or system under any claim of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627 and 5,871,908, other than for the amount of product contained herein.

[L52] Rox Reference Dye (Research Field)
Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,928,907. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

[M40] Thermostable RNase H
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 7,422,888 and its foreign counterpart patent claims.

[M57] LA Technology
This product is covered by the claims 6-16 outside the U.S. corresponding to the expired U.S. Patent No. 5,436,149.

[M82] Tli RNaseH Plus
This product is the subject of the pending JP patent application.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201309Da